

学位論文の要約

A new multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis
of periprosthetic joint infection.

(人工関節周囲感染の診断における Multiplex リアルタイム PCR)

Masaki Kawamura

川村 正樹

Orthopedic Surgery

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 運動器病態学

(Doctoral supervisor : Tomoyuki Saito, Professor)

(指導教員 : 齋藤 知行 教授)

学位論文の要約

A new multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of periprosthetic joint infection.

(人工関節周囲感染の診断における Multiplex リアルタイム PCR)

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14397595.2017.1295825>

背景

人工関節周囲感染 (periprosthetic joint infection; PJI) は診断および治療に難渋する疾患である。感染の確定診断には細菌培養検査による起炎菌の同定がゴールドスタンダードとされてきた。しかし近年、細菌培養のみでは検出できない viable but non-cultivable state (VNC) の存在が報告されている (Ramamurthy et al. 2014)。そのため感染の正確な診断には細菌培養検査だけでなく分子生物学的な検査などの複数の検査で総合的に判断する必要がある。

本研究は、PJI 診断において新たに取り入れた Multiplex プライマー、プローブ (表 1) を用いた Multiplex リアルタイム Polymerase Chain Reaction (PCR) 法の有用性および、そのプライマー、プローブの菌種の検出範囲を臨床分離菌株を用いて調査した。さらに培養陰性の PJI に対する PCR 法の有用性を検討した。本研究の目的は PJI を中心とする整形外科領域の感染症に対して、新たに導入した Multiplex リアルタイム PCR 法の有用性および培養陰性の PJI に対する PCR 法の有用性を評価することである。また臨床分離菌株を用いて、今回使用したプライマー、プローブの菌種の検出範囲を検討することである。

対象と方法

2012 年 4 月から 2016 年 6 月の術前後、術中に採取した関節液および組織 151 検体 (感染 45 検体, 非感染 106 検体) 対象に Multiplex リアルタイム PCR 法を施行した。本 PCR 法は 2 種類の PCR を同時に施行することが

可能であり，一つは MRS を特異的に検出する MRS-PCR で，もう一方は今回新しく導入した Multiplex プライマー，プローブを用いて一般細菌を検出する Universal-PCR を使用した．Universal-PCR の検査判定はネガティブコントロールとの差 (Δ CT) を定量評価し，receiver operating characteristic (ROC) 解析を用いカットオフ値を決定した．さらに培養陰性の PJI に対して本 PCR 法を施行した．2014 年 11 月から 2015 年 4 月に検査室より分離された臨床分離菌株 27 種類に対して Multiplex プライマー，プローブを用いた PCR 法を施行し検出範囲を調査した．

結果

細菌培養陽性は 26 例 48 検体で，*Staphylococcus aureus* が 9 例 21 検体と最も多く，MRS は 6 例 11 検体，グラム陽性菌は 15 例 29 検体，グラム陰性菌は 6 例 12 検体であった．また混合感染は 2 例 4 検体に認めた，それぞれグラム陽性菌と陰性菌の組み合わせが 1 例，グラム陰性菌同士の組み合わせが 1 例であった．MRS-PCR の感度は 91%，特異度は 98% で，カットオフ値を 2.43 で Universal-PCR の感度は 87%，特異度は 83% であった．

臨床分離菌株における MRS-PCR の感度，特異は共に 100%，グラム陽性菌，グラム陰性菌は全て検出可能であったが，*Stenotrophomonas maltophilia* のみ判別が不能であり，グラム陽性陰性の判別一致率は 96% であった(表 2)．

考察

PJI の治療方針を決定するのに診断は非常に重要であり，われわれは診断ツールとして PCR の有用性を報告してきた．本研究でも 87% と高い感度であり，今回導入した Multiplex プライマープローブを使用した PCR 法は迅速性にすぐれており，有用であったと考える．

細菌培養検査は最も一般的であるが，Kobayashi らは細菌培養検査 74 例の細菌培養陰性のうち，9 例 (12%) でリアルタイム PCR 陽性の PJI を認めたと報告している (Kobayashi et al. 2008)．細菌培養検査では抗菌薬投下，バイオフィルム内の細菌は培養されにくく，偽陰性になる可能性があり，Tzeng らはバイオフィルムを形成する細菌において従来の診断法では容易ではないため，分子生物学的診断などを取り入れるべきと報告してい

る (Tzeng A 2015). また Jahoda らは培養検査の細菌検出率が 53.2 % に対して PCR では 79.8 % であり, さらに検出されたブドウ球菌の 47.2% がバイオフィルム産生菌であったと報告している (Jahoda et al. 2014).

本研究において培養陰性で PCR 陽性は 24 検体で, そのうち感染と診断基準を満たしているものは 8 検体であった. この 8 検体は抗菌薬投与後やインプラント周囲のバイオフィルム形成などが原因で, 生きているが培養されない状態であることが考えられた. PCR はバイオフィルム産生菌に対しても高い検出率を持っており, 培養陰性の場合においても有用であると考ええる。

表 1. Multiplex プライマー, プロープ

MRS Primers and Probe	
MRS Primer <i>mecA</i> -For	CATTGATCGCAACGTTCAATT
MRS Primer <i>mecA</i> -Rev	TGGTCTTTCTGCATTCTGG
MRS probe-FAM	TGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCAT
Universal Primers	
16S-For	CAAACAGGATTAGATACCCTGGT
16S 2-For	CRAACAGGATTAGATACCCTGGT
16S-Rev	GGTAAGGTTCTTCGCGTTGC
16S 2-Rev	GGTAAGGTTCTTCGCGTATC
Universal Probes	
<i>E. coli</i> -HEX	TCAATTCATTTGAGTTTAACTTGCGGC
<i>B. fragilis</i> -HEX	ATTCCTTTGAGTTTCACCGTTGCCG
<i>Streptococcus</i> -FAM	CAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGG
<i>M. luteus</i> -FAM	TCAATTCTTTGAGTTTTCAGCCTTGCGG
<i>Staphylococcus</i> sp-FAM	CAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACC

表 2. 当院検査室より分離された臨床分離菌株と PCR 結果

	Bacterial species	PCR detection (gram-positive or gram-negative bacteria)
Gram-positive bacteria	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MRSE)	Gram-positive
	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Gram-positive
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (MRS)	Gram-positive
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-positive
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gram-positive
	<i>Staphylococcus hominis-hominis</i>	Gram-positive
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Gram-positive
	<i>Streptococcus sanguis</i>	Gram-positive
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Gram-positive
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Gram-positive
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram-positive
	<i>Enterococcus faecium</i>	Gram-positive
	<i>Propionibacterium acnes</i>	Gram-positive
Gram-negative bacteria	<i>Escherichia coli</i>	Gram-negative
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram-negative
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	Gram-negative
	<i>Enterobacter doacae</i>	Gram-negative
	<i>Haemophilus influenza</i>	Gram-negative
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Gram-negative
	<i>Serratia marcescens</i>	Gram-negative
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Gram-negative
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Gram-negative
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Gram-negative
	<i>Citrobacter freundii</i>	Gram-negative
	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Gram-negative
	<i>Proteus mirabilis</i>	Gram-negative
	<i>Morganella morganii</i>	Gram-negative
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Gram-positive ^a

^a*Stenotrophomonas maltophilia* was incorrectly identified as gram-positive.

【引用文献】

Jahoda D, Landor I, Benedik J, Pokorny D, Judl T, Bartak V, et al. PCR diagnostic system in the treatment of prosthetic joint infections. *Folia microbiologica*. 2014.

Kobayashi N, Procop G W, Krebs V, Kobayashi H, Bauer T W. Molecular identification of bacteria from aseptically loose implants. *Clinical*

orthopaedics and related research. 2008; 466 (7): 1716-25.

Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani G P, Shinoda S. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. Frontiers in public health. 2014; 2: 103.

Tzeng A T H, Vasdev S, Korth K, Healey T, Parvizi J, Saleh JK. Treating periprosthetic joint infections as biofilms. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2015; 81: 192-200.

【論文目録】

I 主論文

A new multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of periprosthetic joint infection.

Masaki Kawamura, Naomi Kobayashi, Yutaka Inaba, Hyonmin Choe, Taro Tezuka, So Kubota, Tomoyuki Saito

Modern Rheumatology

2017 Mar 8:1-7.

II 参考論文

科感染症診断における顆粒球エラスターゼキットの有用性

川村正樹 小林直実 稲葉 裕 崔 賢民 手塚太郎 友山瑛人 齋藤知行

日本骨・関節感染症学会雑誌

第 31 巻 32-35 頁 平成 29 年

人工関節周囲感染診断におけるリアルタイム PCR 法の有用性と今後の展望

小林直実, 稲 葉裕, 川村正樹, 崔 賢民, 齋藤知行

日本整形外科学会雑誌

第 90 巻 1023-1027 頁 平成 28 年

Preinjury factors that influence the outcome of patients with hip fracture

Kawamura M, Kobayashi N, Inaba Y, Yukizawa Y, Choe H, Kubota S, Matsuda Y, Saito T

Journal of Osteoporosis and Physical Activity

4: 2, 2016.

Effects of hip joint center location and femoral offset on abductor muscle strength after total hip arthroplasty

Tezuka T, Inaba Y, Kobayashi N, Ike H, Kubota S, Kawamura M, Saito T.

Modern Rheumatology

2015 Jul;25(4):630-6.

Evaluation of local bone turnover in painful hip by 18F-fluoride positron emission tomography

Kobayashi N, Inaba Y, Tezuka T, Ike H, Kubota S, Kawamura M, Saito T.

Nuclear Medicine Communications

2016 Apr;37(4):399-405.

Influence of Pelvic Tilt on Polyethylene Wear after Total Hip Arthroplasty

Tezuka T, Inaba Y, Kobayashi N, Ike H, Kubota S, Kawamura M, Saito T.

BioMed Research International

2015; 2015: 327217.

表面置換型人工股関節置換術後の腸腰筋インピンジメントに対して股関節鏡下腸腰筋切除術を施行した 1 例

川村正樹，稲葉 裕，小林直実，池 裕之，手塚太郎，久保田聡，齋藤知行
hip joint

第 41 巻 252-255 頁 平成 27 年

大腿骨近位部骨折患者の転機と収支に影響を及ぼす因子の検討

川村正樹 稲葉 裕 小林直実 池 裕之 手塚太郎 久保田聡 齋藤知行

神奈川整形災害外科学会誌

第 28 巻 第 4 号 107-109 頁 平成 28 年

初診時軽微な骨傷が見逃され、遅発性麻痺を生じた強直性脊椎障害の 2 例

川村正樹，中村潤一郎，渡邊竜樹，松宮基英，大澤克成，杉元紳太郎，三橋成行，齋藤知行

神奈川整形災害外科学会誌

第 27 巻 123-125 頁 平成 27 年

新しい結紮糸と H A スペースーを使用した頸椎椎弓形成術

川村正樹，中村潤一郎，渡邊竜樹，松宮基英，大澤克成，杉元紳太郎，三橋成行，齋藤知行

神奈川整形災害外科学会誌

第 27 巻 119-121 頁 平成 27 年

関節リウマチにおける Linked type 人工肘関節置換術の臨床成績

川村正樹，熊谷 研，草山喜洋，手塚太郎，林田健太，長岡亜紀子，稲葉裕，齋藤知行

関東リウマチ，

第 48 巻 228-234 頁 平成 27 年